مطالعه فعالیت و ارزیابی اثرات pH و دما بر سرین پروتئاز و سیستئین پروتئاز در کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا*

لیلا کیانی‌فرد[۱]، محمد یخچالی[۲]*، مهدی ایمانی[۳]

تاریخ دریافت ۱۳۹۷/۰۸/۲۶ تاریخ پذیرش ۱۳۹۷/۱۱/۱۸

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: فاسیولوزیس یک بیماری انگلی مشترک است که توسط ترماتود *فاسیولا هپاتیکا* ایجاد می‌شود. پروتئازها جهت بقای انگل‌ها ضروری می‌باشند. هدف از این مطالعه جهت بررسی فعالیت و مطالعه اثرات pH و دما بر سرین پروتئاز و سیستئین پروتئاز در ترماتود *فاسیولا هپاتیکا* بود.

مواد و روش کار: ترماتودهای بالغ *فاسیولا هپاتیکا* از کبد گاوهای کشتار شده در کشتارگاه شهرستان ارومیه جدا شدند و میزان پروتئین آن‌ها اندازه‌گیری شد. فعالیت پروتئولیتیک عصاره کرم بالغ با استفاده از سوبسترای آزوکازئین در محدوده pH ۲ تا ۱۲ موردبررسی قرار گرفت. سوبسترای ویژه تریپسین، کیموتریپسین و کاتپسین B برای سنجش آنزیم‌های پروتئازی استفاده شد. اثر مهارکننده‌های پروتئازی پپساتین، DTT، PMSF و EDTA بر روی این آنزیم‌ها بررسی شد. برآورد دما و pH بهینه در محدوده دمایی ۹۰-۱۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۲-۲ pH بود.

یافته‌ها: pH بهینه فعالیت برای تریپسین و کیموتریپسین قلیایی و فعالیت پروتئولیتیکی و کاتپسین B اسیدی بود. فعالیت سرین پروتئاز و سیستئین پروتئاز در *فاسیولا هپاتیکا* ثبت گردید. دمای بهینه برای فعالیت تریپسین و کیموتریپسین در ۵۰ درجه سانتی‌گراد و کاتپسین B در ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. هر سه پروتئاز پایداری دمایی تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد را نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: ثبات دمایی بالای پروتئازهای *فاسیولا هپاتیکا* نشان داد که به‌عنوان یک عامل بالقوه می‌توانند کاربردی زیستی در تهیه واکسن و داروهای ضد انگلی داشته باشند.

کلیدواژه‌ها: *فاسیولا هپاتیکا*، سرین پروتئاز، سیستئین پروتئاز، pH، دما

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و نهم، شماره دوازدهم، ص ۹۱۲-۹۰۴، اسفند ۱۳۹۷

آدرس مکاتبه: ارومیه، کیلومتر ۱۲ جاده سرو، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، بخش انگل‌شناسی، تلفن: ۰۹۰۳۰۷۲۰۸۲۳

Email: m.yakhchali@urmia.ac.ir

مقدمه

آلودگی‌های انگلی یکی از مهم‌ترین معضلات بهداشت عمومی در دنیا به‌خصوص در کشورهای درحال‌توسعه به شمار می‌رود. فاسیولوزیس یکی از بیماری‌های انگلی زئونوز با اهمیت جهانی که توسط ترماتود *فاسیولا هپاتیکا* در انسان و حیوانات اهلی ایجاد می‌شود (۱). تقریباً ۱۷ میلیون مورد انسانی در ۶۱ کشور با ۱۸۰ میلیون نفر در معرض خطر فاسیولوزیس قرار دارد (۲). ازنظر اقتصادی نیز فاسیولازیس یک بیماری با اهمیت در حیوانات اهلی است که تأثیر زیادی بر روند رشد، تکامل و تولیدمثل نشخوارکنندگان دارد. آلودگی با این انگل باعث ضررهای اقتصادی گسترده‌ای در حدود سه میلیارد دلار در سال در سراسر جهان می‌شود (۲، ۳). پروتئازها برای بقای انگل‌ها ضروری هستند و فعالیت‌های مهمی مانند تهاجم، تغذیه، باروری، فرار از سیستم ایمنی و سایر نقش‌های احتمتا را بر عهده دارند (۴، ۵). در بسیاری از انگل‌های کرمی نظیر *شیستوزوما مانسونی* و *فاسیولا ژیگانتیکا* آنزیم‌های پروتئولتیک متعلق به گروه‌های سرین پروتئاز و سیستئین پروتئاز جدا شده‌اند (۶،۷). یک نوع از پروتئازها در *شیستوزوما مانسونی* ازنظر اسیدهای آمینه و سوبسترا، مشابه پروتئاز کاتپسین آل (Cathepsin L, CL)است (۸) پروتئازها به‌عنوان یک هدف بالقوه برای واکسیناسیون دام‌های حساس مطرح می‌باشند (۹). ایمن‌سازی نشخوارکنندگان اهلی توسط پروتئین‌های CL1 و CL2 *فاسیولا هپاتیکا* منجر به کاهش معناداری در باروری

[۱] دکتری تخصصی انگل شناسی، گروه پاتوبیولوژی، بخش انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، بخش انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] دانشیار گروه علوم پایه، بخش بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

و تولید تخم کرم گردیده است (۱۱، ۱۰). در این رابطه، وجود کاتپسین B در مرحله بالغ، جوان و متاسرکر *فاسیولا ژیگانتیکا* گزارش شده است (۱۲). این آنزیم در فرار از ایمنی (۱۳)، هضم مواد غذایی (۱۴)، تهاجم به سلول‌ها و بافت‌های میزبان (۱۵)، بقای انگل با تغییر در پروتئین‌های مضر میزبان (۱۶) و تشخیص فاسیولوزیس (۱۷) استفاده می‌شود. به‌عبارت‌دیگر انگل‌ها از پروتئازها برای ایجاد محیط مناسب در داخل بدن میزبان استفاده می‌کنند (۱۸). همچنین نماتودهای انگلی حیوانات و گیاهان تعدادی از سرین پروتئازها و متالوپروتئازها را که برای نفوذ و مهاجرت بافتی ضروری هستند، بیان می‌کنند (۶). از سوی دیگر، حشرات انگلی پستانداران از سرین پروتئازها در ایجاد محیط مناسب بر روی میزبان و یا در داخل بدن آن‌ها استفاده می‌کنند (۱۴). علاوه بر این، سرین پروتئازها در همه موجودات تحت مطالعه یافت می‌شوند و در لخته شدن خون، فعال‌سازی کمپلمان و شمار زیادی از پدیده‌های بیولوژیکی دیگر نیز مشارکت می‌کنند (۱۹). این اصل باعث می‌شود که پروتئازها هدف کلیدی برای ساخت واکسن و توسعه داروهای ضد انگل باشند (۲۰). در مطالعه حاضر آنزیم‌های سرین پروتئاز و سیستئین پروتئاز مربوط به انگل بالغ *فاسیولا هپاتیکا* با استفاده از سوبستراها و pH بهینه برای فعالیت سوبستراها موردبررسی قرار گرفت. درنهایت الگوهای مهار پروتئازهای مذکور توسط مهارکننده‌های پروتئازی مختلف ارزیابی شد. به دلیل اهمیت بالقوه پروتئازها در تهیه واکسن و داروهای ضد انگل، پایداری دمایی پروتئازهای *فاسیولا هپاتیکا* در شرایط مختلف دمایی موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

جداسازی و تهیه عصاره *فاسیولا هپاتیکا*: کرم‌های بالغ *فاسیولا هپاتیکا* از کبد گاوهای آلوده کشتار شده در کشتارگاه شهرستان ارومیه جدا شدند. کرم‌ها توسط محلول بافر فسفات نمکی ۰/۰۱ درصد (PBS, phosphate buffered saline)چند بار شستشو داده شدند و پس از له شدن در هاون و هموژن کردن، مخلوط چند بار در نیتروژن مایع برده شد. مخلوط لیز شده در ۱۶۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاصل به میکروتیوب‌های جدید منتقل شد و دوباره سانتریفیوژ گردید. برای اندازه‌گیری پروتئین تام از روش برادفورد استفاده شد (۲۱).

سنجش فعالیت پروتئولیتیک کل: برای اثبات وجود فعالیت آنزیمی، سنجش فعالیت پروتئولیتیک کل و تعیین مناسب‌ترین pH که در آن بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی وجود دارد، از سوبسترای پروتئینی آزوکازئین در pH های ۲ تا ۱۲ بر مبنای روش Elpidina و همکاران استفاده شد (۲۲). مخلوط واکنش شامل ۳۰ میکرولیتر محلول آزوکازئین ۲ درصد در ۹۰ میکرولیتر بافر یونیورسال از هر کدام از pH های ۲ تا ۱۲ (حاوی استات – فسفات- بورات سدیم ۵۰ میلی مولار) و ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. هضم پروتئینی با افزودن ۳۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۳۰ درصد، متوقف و آزوکازئین هیدرولیز نشده موجود در واکنش، با قرار دادن در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت به‌طور کامل رسوب داده شد و سپس با سرعت g× ۱۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. ۷۵ میکرولیتر از محلول رویی نمونه‌ها و ۷۵ میکرولیتر از سدیم هیدروکسید یک نرمال داخل میکروپلیت ریدر اضافه شد و جذب نوری آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر تعیین گردید. در گروه شاهد نیز به جای عصاره آنزیمی از آب مقطر استفاده شد و آزمایش با سه تکرار انجام گردید.

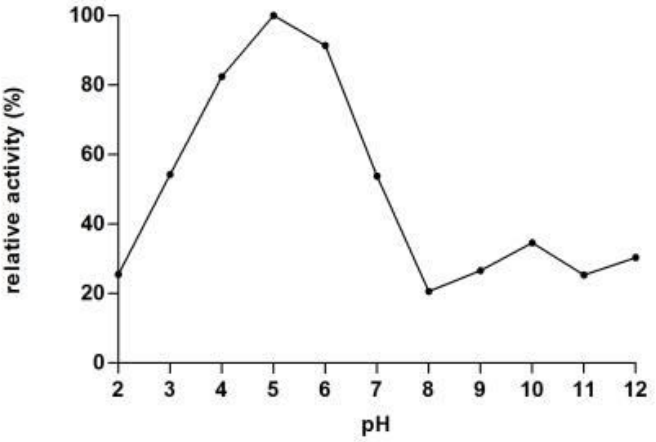
سنجش فعالیت سرین پروتئازها: برای سنجش تریپسین از سوبسترای (Na- benzoyl-L-argininc- p-nitroanilide) BApNAو کیموتریپسین از سوبسترای SAAPFpNA (N-succinyl-alanine-alanine-prolin-phenylalaninc-p-nitroanilide)با غلظت نهایی ۱ میلی مولار استفاده گردید (۲۳، ۲۴) روش سنجش فعالیت تریپسین و کیموتریپسین شبیه به هم است. در این سنجش ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۵ میکرولیتر محلول سوبسترا و ۸۵ میکرولیتر بافر یونیورسال با pH های ۲ تا ۱۲ اضافه شد. آزمایش با سه تکرار در حضور شاهد انجام گردید و میزان جذب نوری نیز در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از میکروپلیت ریدر ثبت شد. برآورد دما و pH بهینه در محدوده دمایی ۱۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد و pH در محدوده ۲ تا ۱۲ انجام شد. پایداری حرارتی با اندازه‌گیری فعالیت باقی مانده آنزیم‌ها پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دماهای مختلف قبل از افزودن سوبسترا بررسی شد.

سنجش فعالیت سیستئین پروتئاز: در این سنجش ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۵ میکرولیتر محلول سوبسترا و ۸۵ میکرولیتر بافر یونیورسال با pH های ۲ تا ۱۲ اضافه شد. برای سنجش فعالیت سیستئین پروتئاز از Z-Phe-Arg-pNA سوبسترای ویژه‌ی کاتپسین B با غلظت نهایی ۱ میلی مولار استفاده گردید (۲۵). آزمایش با سه تکرار در حضور شاهد انجام گردید و میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از میکروپلیت ریدر ثبت گردید. برآورد دما و pH بهینه در محدوده دمایی ۱۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد و pH در محدوده ۲ تا ۱۲ انجام شد.

سنجش فعالیت پروتئازها با استفاده از مهارکننده‌ها: انواع پروتئازها با استفاده از مهارکننده‌های شناخته شده برای هر کلاس با استفاده از آزوکازئین به‌عنوان سوبسترا ارزیابی شد (۱۵). مهارکننده سرین پروتئاز PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)(۵ میلی مولار)، مهار کننده آسپارتیک پروتئاز پپساتین (۱۰ میکرو مولار)، مهار کننده متالو پروتئاز EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (۱۰ میلی مولار) و DTT (Dithiothreitol) (۱۰۰ میکرو مولار) به‌عنوان ترکیب احیا کننده و فعال کننده سیستئین پروتئازها استفاده شد. مهارکننده‌ها قبل از استفاده ۲۰- ۱۵ دقیقه با عصاره آنزیمی تیمار شدند. مخلوط واکنش شامل ۳۰ میکرولیتر محلول آزوکازئین ۲ درصد در ۹۰ میکرولیتر بافر یونیورسال و ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. هضم پروتئینی با افزودن ۳۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۳۰ درصد متوقف و آزوکازئین هیدرولیز نشده موجود در واکنش با قرار دادن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت به‌طور کامل رسوب داده شد و سپس با سرعت $g\times$ ۱۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۷۵ میکرولیتر از محلول رویی نمونه‌ها و ۷۵ میکرولیتر از سدیم هیدروکسید یک نرمال داخل میکروپلیت ریدر اضافه شد و جذب نوری آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر تعیین شد. هر یک از آزمون‌های مربوط به تیمار و شاهد در سه تکرار انجام شد. در گروه شاهد به جای عصاره آنزیمی از آب مقطر استفاده گردید.

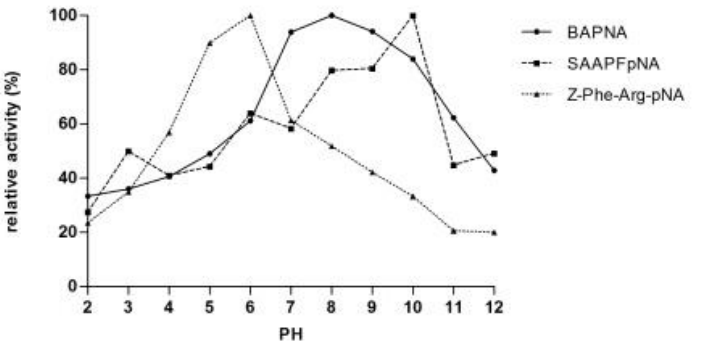
یافته‌ها

فعالیت پروتئولیتیک کل: مقدار پروتئین کل عصاره *فاسیولا هپاتیکا* ۱/۱۳ ± ۱/۱۴ میلی‌گرم در میلی لیتر بود. فعالیت پروتئولیتیک کل و pH بهینه در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. اثر آزوکازئین بر روی عصاره آنزیمی در دامنه‌ی قلیایی تا اسیدی (۱۲-۲ pH) بود. حداکثر فعالیت پروتئولیتیک در عصاره آنزیمی در ۵ pH ثبت گردید. البته آنزیم در ۶-۴ pH همچنان فعالیت بالایی داشت، به‌طوری که فعالیت آن در ۶ pH به میزان ۹۱/۳۸ درصد بود. ولی این فعالیت به‌طور قابل‌توجهی در pH قلیایی کاهش یافت.



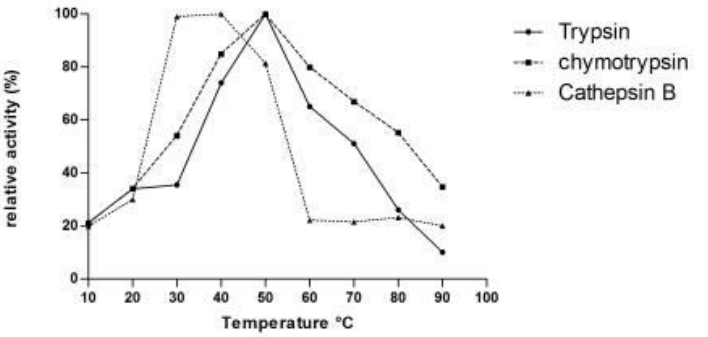
نمودار (۱): فعالیت پروتئولیتیک کل عصاره کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا* در سطوح مختلف pH با استفاده از سوبسترای آزوکازئین.

فعالیت سرین پروتئاز (تریپسین و کیموتریپسین) و سیستئین پروتئاز (کاتپسین B): فعالیت سرین پروتئاز و سیستئین پروتئاز عصاره *فاسیولا هپاتیکا* در ۱۲-۲ pH در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. سوبستراهای اختصاصی تریپسین (BAPNA)، کیموتریپسین (SAAPFpNA) و کاتپسین B (Z-Phe-Arg-pNA) در ۱۲-۲ pH هیدرولیز گردیدند. بیشترین فعالیت عصاره *فاسیولا هپاتیکا* در مقابل BAPNA در pH۸ بود. البته عصاره آنزیمی در ۱۰-۷ pH فعالیت بالایی نشان داد (فعالیت ۹۴/۱۶ درصد در ۹ pH). بالاترین فعالیت عصاره برای SAAPFpNA در ۱۰ pH بود. همچنین فعالیت بالایی در ۱۰-۸ pH مشاهده‌گردید. برخلاف فعالیت سرین پروتئاز در pH قلیایی، بهینه فعالیت عصاره *فاسیولا هپاتیکا* برای Z-Phe-Arg-pNA در ۵ pH بود، ولی فعالیت عصاره در pH۶ به میزان ۸۹/۴ درصد بود.

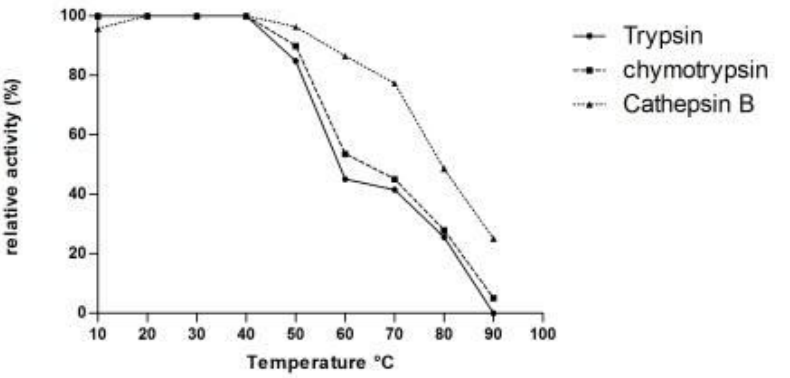


نمودار (۲): pH بهینه فعالیت تریپسین، کیموتریپسین و کاتپسین B پروتئاز های عصاره کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا* در سطوح مختلف pH با استفاده از سوبستراهایBAPNA، SAAPFpNA ، Z-Phe-Arg-pNA.

بهینه فعالیت و پایداری دمایی سرین پروتئاز و سیستئین پروتئاز: دمای مطلوب فعالیت تریپسین و کیموتریپسین ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. در حالی که دمای بهینه برای کاتپسین B در حدود ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود (نمودار ۳). فعالیت سرین پروتئاز به سرعت با افزایش دما افزایش یافته و بیشتر از فعالیت سیستئین پروتئاز بود (نمودار ۴). این پروتئازها تا دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد پایدار بودند ولی با افزایش دما کاهش فعالیت آن‌ها به‌صورت قابل ملاحظه‌ای بروز کرد. در حالی که کاتپسین B مقاومت بیشتری نسبت به دمای بالا در مقایسه با تریپسین و کیموتریپسین نشان داد.



نمودار (۳): دمای بهینه فعالیت تریپسین، کیموتریپسین و کاتپسین B پروتئاز های عصاره کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا*.



نمودار (۴): ثبات دمایی فعالیت تریپسین، کیموتریپسین و کاتپسین B پروتئاز های عصاره کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا*.

حساسیت به مهارکننده‌های پروتئازی: اثر مهار کننده‌ها در مهار فعالیت پروتئازی موردبررسی قرار گرفتند (جدول ۱). PMSF اثر مهار کنندگی قابل‌توجهی نسبت به فعالیت پروتئولیتیک نشان داد. ولی پپساتین و EDTA تأثیر کمی در مهار فعالیت پروتئولتیک داشتند. فعالیت آنزیمی توسط PMSF ۵۹/۶ درصد، EDTA ۳ درصد و پپستاتین ۱۰ درصد کاهش پیدا کرد. ولی استفاده از مهار کننده تیول پروتئاز (DTT) منجر به افزایش فعالیت آنزیمی گردید.

جدول (۱): تأثیر مهارکننده‌های پروتئازی بر فعالیت پروتئازی عصاره کرم بالغ فاسیولا هپاتیکا.

پروتئاز هدف	مهارکننده	غلظت (میلی مولار)	باقی مانده فعالیت (درصد)
سرین پروتئاز	PMSF	۵	۴۰/۴±۱/۱۴
سیستئین پروتئاز	DTT	۱۰۰	۱۵۵/۵±۱۱/۱۹
آسپارتیک پروتئاز	Pepstatin	۱۰	۹۰± ۶/۰۸
متالو پروتئاز	EDTA	۱۰	۹۷± ۵/۱۱

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، فعالیت پروتئولیتیک عصاره کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا* بررسی گردید و الگوی مهار آن توسط مهارکننده‌های پروتئازی ارزیابی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که پروتئازهای عصاره کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا* در دامنه وسیعی از pH، آزوکازئین را به‌عنوان سوبسترای پروتئینی هیدرولیز نموده و بیشینه فعالیت آن در pH اسیدی بود. با این حال، در این مطالعه سوبستراهای BAPNA،SAAPFpNA وZ-Phe-Arg-pNA برای نشان دادن فعالیت پروتئازی اختصاصی‌تر بودند و با استفاده از سوبستراهای مذکور و مهارکننده‌های پروتئازی، به نظر می‌رسد که کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا* به‌ترتیب دارای سرین پروتئاز (تریپسین و کیموتریپسین) و سیتیئن پروتئاز (کاتپسین B) است. نتایج این تحقیق نشان داد که pH بهینه فعالیت سرین پروتئاز در pH قلیایی و سیستئین پروتئاز در pH اسیدی بود که با مطالعات Ribeiro de Andrade و همکاران و Michalski و همکاران بر روی سرین پروتئازها در تک یاخته‌ها مشابهت داشت (۲۷، ۲۶). مطالعات Mohamed و همکاران نیز نشان داد که سرین پروتئاز *فاسیولا ژیگانتیکا* بهینه فعالیت را در pH ۷/۵ داشت (۷). دو فعالیت مهم پروتئازی در انگل *Heliothis virescens* گزارش شده است. آنزیم تریپسین BAPNA را هیدرولیز نموده و آنزیم کیموتریپسین سنتتیک را هیدرولیز کرد (۱۸). در تحقیق دیگری حداکثر فعالیت پروتئولیتیک کرم بالغ *فاسیولا ژیگانتیکا* در ۶-۴ pH بود (۲۸). گر چه برخی از فعالیت‌های پروتئولیتیک این ترماتود در pH۱۰ نیز نشان داده شد. در این انگل فعالیت مطلوب سیستئین پروتئاز در pH ۴/۵ گزارش گردید (۲۸). بر این اساس در این انگل مهارکننده‌های سیستئین پروتئاز بیشترین اثر مهار کنندگی را بر فعالیت پروتئولیتیک داشتند به‌طوری که اثر مهاری PMSF و پپساتین به‌ترتیب ۳۷ درصد و ۱۴ درصد بود. در حالی که EDTA فعالیت پروتئولیتیک را در *فاسیولا ژیگانتیکا* مهار نکرد که نشان‌دهنده وجود فعالیت‌های سرین پروتئاز و آسپارتیک پروتئاز در این انگل بود (۲۸). فعالیت کاتپسین- آل کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا* در محدوده pH۵ تا ۹ (با حداکثر فعالیت در ۸ pH) گزارش شد (۲۹).

در مطالعه حاضر، فعالیت عصاره کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا* توسط مهارکننده PMSF کاهش یافت. همچنین پپساتین و EDTA تأثیر اندکی در مهار فعالیت پروتئولتیک از خود نشان دادند. ولی تیول پروتئاز فعالیت آنزیمی عصاره *فاسیولا هپاتیکا* را افزایش داد. در گزارشی تیول پروتئاز *پاراگونیموس وسترمانی* و *شیستوزوما مانسونی* توسط مهار کننده تیول پروتئاز مهار شد (۳۱، ۳۰). همچنین، سرین پروتئاز نیز توسط مهارکننده‌های سرین پروتئاز در *لیشمانیا آمازوننسیس* و *Heliothis virescens* مهار گردید (۱۸، ۱۵). در بررسی دیگری پروتئازهای مترشحه از *فاسیولا هپاتیکا* در شرایط آزمایشگاهی از نوع سیستئین پروتئاز گزارش شدند که با یافته‌های این تحقیق مطابقت نداشت (۳۲). ولی در مطالعات دیگری سایر گروه‌های پروتئازها مثل سرین پروتئاز و آسپارتیک پروتئاز در *فاسیولا هپاتیکا* گزارش شدند (۳۳،۳۴). نتایج بررسی بر روی عصاره کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا* نشان داد که سیستئین پروتئاز نسبت به غلظت‌های بسیار کم مهارکننده‌های سیستئینی بسیار حساس است به‌گونه‌ای که مهار کننده E64 باعث کاهش ۹۳ درصدی فعالیت پروتئولیتیک گردید. در حالی که PMSF اثرات مهاری کم‌تری نسبت به E64 داشت و EDTA نیز هیچ تاثیری بر فعالیت پروتئازی نداشت (۲۵). استفاده از

مهارکننده‌های سرین پروتئاز، سیستئین پروتئاز، آسپارتیک پروتئاز و متالو پروتئاز نشان داد که سرین پروتئاز و سیستئین پروتئاز و برخی از فعالیت‌های آسپارتات پروتئاز و متالو پروتئاز در مراحل مختلف زندگی *فاسیولا هپاتیکا* وجود دارد (۳۶). Khmelnitsky و همکاران نشان دادند که کاتپسین آل *فاسیولا هپاتیکا* دو تا سه برابر پایدارتر از کیموتریپسین است (۳۷). در تحقیق پایداری دمایی کاتپسین B نسبت به تریپسین و کیموتریپسین در عصاره کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا* نشان داد که آنزیم کاتپسین آل- یک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در pH ۷ کاملاً فعال باقی مانده و بعد از ۷۲ ساعت ۹۰ درصد از فعالیت اش را حفظ کرد (۲۹). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که دمای مطلوب فعالیت پروتئازهای تریپسین و کیموتریپسین در عصاره کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا* ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. گرچه دمای بهینه برای سیستئین پروتئاز (کاتپسین B) در عصاره کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا* ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود ولی پایداری فعالیت دمایی در هر سه پروتئاز تا دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ثابت بود که با مطالعات Mohamed و همکاران و Dowd و همکاران هم‌خوانی داشت (۲۹، ۷).

مطالعه پروتئازها به‌عنوان یک هدف بالقوه در تهیه واکسن و داروهای ضد انگلی مطرح می‌باشند. بنابراین جداسازی و خالص سازی پروتئازهای انگلی می‌تواند برای شناسایی راه کارهای مبارزه با بیماری‌های انگلی از طریق تولید واکسن‌های مناسب و کارآمد مطرح باشد. استفاده از مهارکننده‌های پروتئازی از طریق ایجاد اختلال در فعالیت‌های آنزیمی انگل نظیر مهاجرت، تهاجم بافتی و فرار از سیستم ایمنی می‌تواند موجب کاهش فعالیت انگل گردد. لذا نتایج حاصل از این تحقیق از طریق تعیین میزان pH و دمای بهینه فعالیت آنزیمی می‌تواند در افزایش کارایی اثر مهارکنندگی مهارکننده‌های پروتئازی در کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا* مفید باشد. پایداری دمایی بالای پروتئازهای کرم بالغ *فاسیولا هپاتیکا* نشان داد که آن‌ها می‌توانند به‌عنوان یک رهیافت برای استفاده در برنامه‌های کنترل زیستی نیز مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری کارشناسان بخش انگل‌شناسی آقای آرمن بدلی، بخش بیوشیمی خانم افسانه نیاکانی و آقای علی پیرنژاد آزمایشگاه مرکزی و نیز حمایت مالی معاونت آموزشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه در انجام این تحقیق تشکر می‌نمایند.

References:

1-Yakhchali M, Bahramnejad K. Inhibition effect of pH on the hatchability of Fasciola miracidia under laboratory conditions. Iran J Parasitol 2016; 11(1): 30-4.

2-Mas-Coma S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. J Helminthol 2005; 79(3):207-16.

3-Piedrafita D, Spithill TW, Smith RE, Raadsma HW. Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. Parasite Immunol 2018; 32(8):572-81.

4-Horn M, Fajtova P, Rojo Arreola L, Ulrychova L, Bartosova-Sojkova P, Franta Z, Protasio AV, et al. Trypsin- and Chymotrypsin-like serine proteases in Schistosoma mansoni the undiscovered country'. PLo S Negl Trop Dis 2014; 8(3): e2766.

5-Dvorak J, Fajtova P, Ulrychova L, Leontovyc A, Rojo-Arreola L, Suzuki BM, et al. Excretion/secretion products from Schistosoma mansoni adults, eggs and schistosomula have unique peptidase specificity profiles. Biochimie 2016; 122:99-109.

6-Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. Mol Biochem Parasitol 2002; 120(1):1-21.

7-Mohamed SA, Fahmy AS, Mohamed TM, Hamdy SM. Proteases in egg, miracidium and adult of Fasciola gigantica. Characterization of serine and cysteine proteases from adult. Comp Biochem Physiol A Physiol 2005; 142(2):192-200.

8-Brady CP, Brinkworth RI, Dalton JP, Dowd AJ, Verity CK, Brindley PJ. Molecular modeling and substrate specificity of discrete cruzipain-like and cathepsin L-like cysteine proteinases of the human blood fluke Schistosoma mansoni. Arch Biochem Biophysic 2000; 380(1): 46-5.

9-Tellam RL, Bowles VM. Control of blow fly strike in sheep: current strategies and future prospects. Int J Parasitol 1997; 27: 261–73.

10-Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against faciolosis in sheep. Infect Immun 1999; 67: 1954–61.

11-Wijffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, et al. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of Fasciola hepatica decreases worm fecundity. Exp Parasitol 1994; 78(2):132-48.

12-Meemon K, Grams R, Vichasri-Grams S, Hofmann A, Korge G, Viyanant V, et al. Molecular cloning and analysis of stage and tissue-specific expression of cathepsin B encoding genes from Fasciola gigantica. Mol Biochem Parasitol 2004; 136: 1 –10.

13-Dixit AK, Yadav SC, Sharma RL. Experimental bubalian fasciolosis: kinetics of antibody response using 28 kDa Fasciola gigantica cysteine proteinase as antigen. Trop Anim Health Prod 2004; 36: 49–54.

14-Sandeman RM, Feehan JP, Chandler RA, Bowles VM. Tryptic and chymotryptic proteases released by larvae of the blow fly Lucilia cuprina. Int J Parasitol 1990; 20: 1019–23.

15-da Silva-Lopez RE, Giovanni-De-Simone S. Leishmania (Leishmania) amazonensis: purification and characterization of a promastigote serine protease. Exp Parasitol 2004; 107: 173–82.

16-Burleigh BA, Caler EV, Webster P, Andrews N. A cytosolic serine endopeptidase from Trypanosoma cruzi is required for the generation of Ca+2 signaling in mammalian cells. J Cell Biol 1997; 136: 609–20.

17- Tantrawatpan C, Maleewong W, Wongkham C, Wongkham S, Intapan PM, Nakashima K. Serodiagnosis of human faschioliasis by a cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant Fasciola gigantica cathepsin L antigen. Am J Trop Med Hyg 2005: 72: 82–6.

18-Johnston KA, Lee MJ, Brough C, Hilder VA, Gatehouse AMR, Gatehouse JA. Protease activities in the larval midgut of Heliothis virescens: evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. Insect Biochem Mol Biol 1995; 25: 375– 83.

19-Rawling ND, Barret AJ. Families of serine peptidases. Methods Enzymol 1994; 244: 19–45.

20-Molina-Hernandez V, Mulcahy G, Perez J, Martinez-Moreno A, Donnelly S, O'Neill SM, et al. Fasciola hepatica vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. Vet Parasitol 2015; 208(1-2):101-11.

21-Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72(1):248-54.

22-Elpidina EN, Vinokurov KS, Gromenko VA, Rudenskaya YA, Dunaevsky YE, Zhuzhikov DP. Compartmentalization of Proteinases and Amylasesin NauphoetacinereaMidgut. Insect Biochemist Physiol 2001; 48:206–16.

23-Erlanger BF, Cooper AG, Bendich AJ. On the heterogeneity of three-times-crystallized α-Chymotrypsin. Biochem 1964; 3(12):1880-3.

24-Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch Biochem Biophysic 1961; 95(2):271-8.

25-Wijffels GL, Panaccio M, Salvatore L, Wilson L, Walker ID, Spithill TW. The secreted cathepsin L-like proteinases of the trematode, Fasciola hepatica, contain 3-hydroxyproline residues. Biochemic J 1994; 299: 781-90.

26-Ribeiro de Andrade A, Santoro MM, Melo NM, Mares-Guia M. Leishmania (Leishmania) amazonensis: purification and characterization of a soluble serine oligopeptidase from promastigotes. Exp Parasitol 1998; 89: 153–60.

27-Michalski WP, Crooks JK, Prowse SJ. Purification and characterization of a serine-type protease from Eimeria tenella oocytes. Int J Parasitol 1994; 24: 189–95.

28-Fagbemi BO, Hillyer GV. The purification and characterization of a cysteine protease of Fasciola

gigantica adult worms. Vet Parasitol 1992; 43: 223–32.

29-Dowd AJ, Dooley M, Fagain C, Dalton JP. Stability studies on the cathepsin L proteinase of the helminth parasite, Fasciola hepatica. Enzym Microb Technol 2000; 27(8): 599-604.

30-Yamakami K, Hamajima F. A neutral thiol protease secreted from newly excysted metacercariae of trematode parasite Paragonimus westemani: purification and characterization. Comp Biochem Physiol B 1990; 95(4): 755–58.

31-Ghoneim H, Klinkert MQ. Biochemical properties of purified cathepsin B from Schistosoma mansoni. Int J Parasitol Parasites Wild 1995; 25(12):1515-9.

32-Dalton JP, Heffernan M. Thiol proteases released in vitro by Fasciola hepatica. Mol Biochem Parasitol 1989; 35(2):161-6.

33- Hadju E, Matskasi I, Juhasz S. Fasciola hepatica (L. 1758): Studies on protease and protease inhibitor activity. Parasitol Hung 1979; 12:21-30.

34-Rupova L, Keilova H. Isolation and some properties of an acid protease from Fasciola hepatica. Z Parasitenkd 1979; 61(1): 83-91.

35- Pupkis MF, Coombs GH. Purification and characterization of proteolytic enzymes of Leishmania mexicana mexicana amastigotes and promastigotes. J Gen Microbiol 1984; 130: 2375-83.

36-Harmsen MM, Cornelissen JB, Buijs HE, Boersma WJ, Jeurissen SH, van Milligen FJ. Identification of a novel Fasciola hepatica cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. Int J Parasitol Parasites Wild 2004; 34(6):675-82.

37-Khmelnitsky YL, Mozhaev VV, Belova AB, Sergeeva MV, Martinek K. Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. Eur J Biochem 1991; 198:31–41.

Original Article

INVESTIGATING AND EVALUATING THE PROTEASE ACTIVITY AND THE EFFECT OF pH AND TEMPERATURE ON SERINE PROTEASES AND CYSTEINE PROTEASES ACTIVITIES IN ADULT HELMINTH OF FASCIOLA HEPATICA

Leila Kianifard[1], Mohammad Yakhchali[2], Mehdi Imani[3]*

Received: 17 Nov, 2018; Accepted: 07 Feb, 2019

Abstract

Background & Aims: Fascioliasis is a zoonotic disease caused by the trematode Fasciola hepatica. Proteases are essential for the survival of parasites. This study was conducted to evaluate the serine and cysteine proteases of F. hepatica and also to the investigate the effect of pH and temperature on proteases activity and their temperature stability.

Materials & Methods: Adult Fasciola were isolated from infected livers and their protein levels were measured. The total proteolytic activity of the extract of F. hepatica was evaluated using azocasein substrate in pH values from 2 to 12. Trypsin, chymotrypsin and cathepsin B substrates were used to measure protease activity. We evaluated the effect of protease inhibitors, PMSF, pepsin, DTT and EDTA on these enzymes. The estimation of optimum temperature and pH was performed within a temperature range of 10-90 ° C and at pH levels 2-12.

Results: The optimum pH activity of trypsin and chymotrypsin were recorded at an alkaline pH and total proteolytic activity and cathepsin B were recorded at an acidic pH. The results showed that F. hepatica had serine and cysteine protease activity. The optimum temperature activity for trypsin and chymotrypsin was 50 ° C. The optimum temperature activity for cathepsin B was at 30 to 40 ° C. The temperature stability for the three proteases was up to 40 ° C.

Conclusion: The high temperature stability of F. hepatica proteases showed that they could be used as a potential factor in biological applications such as vaccine and anti-parasitic drugs.

Keywords: Fasciola hepatica, Cysteine protease, Serine protease, pH, Temperature

Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Tel: +98 903 072 0823
Email: m.yakhchali@urmia.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2019: 29(12): 912 ISSN: 1027-3727

[1] *PhD condidate of Parasitology, Department of Pathobiology, Parasitology Division, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*
[2] *Professor, Department of Pathobiology, Parasitology Division, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Associate Professor, Department of Basic Sciences, Biochemistry Division, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*